

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : **2.027.356**
 (A n'utiliser que pour
 le classement et les
 commandes de reproduction.)
 (21) N° d'enregistrement national : **69.45316**
 (A utiliser pour les paiements d'annuités,
 les demandes de copies officielles et toutes
 autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

(22) Date de dépôt..... 29 décembre 1969, à 16 h 58 mn.
 (41) Date de la mise à la disposition du
 public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 35 du 25-9-1970.

(51) Classification internationale (Int. Cl.).... **A 61 k 21/00//C 07 d 57/00; C 12 d 9/00.**
 (71) Déposant : Société dite : FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD., rési-
 dant au Japon.

Mandataire : Harlé & Léchopiez.

(54) **Nouvel antibiotique, ses dérivés et sa production.**

(72) Invention : Kei Arima, Gakuzo Tamura, Heiichi Sakai, Masanobu Kohsaka,
 Kazuo Kariyone et Hisatoyo Yazawa.
 (33) (32) (31) Priorité conventionnelle : *Demandes de brevets déposées au Japon le*
30 décembre 1968, n° 83/1969 et le 26 juin 1969, n° 50.780/1969
au nom de la demanderesse.

La présente invention concerne un antibiotique nouveau et utile, ses dérivés et ses procédés de production. Il concerne plus particulièrement un nouvel antibiotique sous des formes variées, et ses procédés de production par fermentation, de même que sa
5 concentration, sa récupération, sa purification, son isolement, et la production de ses dérivés.

L'invention comporte dans son étendue une substance antibiotique sous des formes diluées, comme des concentrés bruts, et sous formes cristallines pures. L'antibiotique désiré et ses déri-
10 vés présentent une haute activité vis-à-vis d'une variété de microorganisme qui comprend des bactéries Gram positives et Gram négatives, des mycobactéries, des champignons et des bactériophages. On a observé in vitro sur quelques virus une forte action pour les détruire. Leurs possibilités d'arrêter la croissance
15 et le développement de certaines tumeurs transplantables et provoquées, est une autre propriété antibiotique importante. Les propriétés antibiotiques des composés les rendent d'une grande utilité comme agents thérapeutiques dans le traitement de nombreuses maladies. L'antibiotique conforme à l'invention est produit par un procédé de fermentation dans des conditions contrô-
20 lées, dans lequel on utilise une espèce de Streptomyces jusqu'à présent inconnue.

LE MICROORGANISME

Le microorganisme utilisé pour la production de cet anti-
25 biotique est une espèce récemment découverte de Streptomyces isolée à partir d'un échantillon d'impureté recueilli à Musashi-Koganei au Japon. Une culture de l'organisme vivant a été déposée, et ajoutée à la collection permanente de réserve de la Collection Américaine de Culture, Rockville, Maryland aux Etats-Unis d'Amé-
30 rique. On lui a donné le numéro ATCC 21 353 et il est désigné dans la suite comme variété de Streptomyces achromogenes tomaymyceticus.

Il est bien entendu qu'en ce qui concerne la production du nouvel antibiotique, l'invention ne se limite pas à l'utilisation
35 de l'organisme particulier décrit, ou d'organismes qui répondent tout à fait aux caractéristiques microscopiques et de croissance décrites ici, que l'on donne à titre illustratif. On désire essentiellement et on se propose d'inclure l'utilisation d'espèces mutantes produites à partir de l'organisme désiré par des moyens variés comme les rayons X, les radiations ultraviolettes, l'ypérite
40

azotée, l'exposition aux phages².

On désire aussi et on se propose d'inclure tout organisme sans tenir compte de son apparence ou de son comportement physiologique, que l'on peut développer par des moyens de transformation, de transduction, de recombinaison génétique, ou d'autres procédés génétiques utilisant un acide nucléique pour former l'espèce décrite, par lesquels on a acquis la possibilité d'élaborer le produit décrit ici, ou d'effectuer la transformation biologique décrite ici.

10 Pour isoler et caractériser le microorganisme, on agit une fraction d'échantillon d'impureté dans de l'eau distillée stérile et on la dépose dans le milieu à base d'agar de Krainsky. Après avoir incubé à 30°C, pendant sept jours, on isole des colonies de variété de *Streptomyces achromogenes tomaymyceticus* ATCC 21 353 à partir du milieu, et on les fait pousser ensuite dans le milieu d'agar de Bennett.

MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE

La morphologie de la variété de *Streptomyces achromogenes tomaymyceticus* ATCC 21 353 qui a poussé dans le milieu de Czapek à 30°C. pendant dix à quatorze jours, est donnée ci-après. La conidie est sphérique ou ovoïde avec une surface polie. On observe un long mycelium aérien ramifié et à chaîne droite ou faiblement incurvé, avec une faible croissance,

CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET DE CULTURE

25 Les caractéristiques physiologiques et de culture de la nouvelle espèce de *S. achrom.* var *tomaymyceticus* ATCC 21 353 dans un certain nombre de milieux sont données ci-après. L'observation a été faite après dix à quatorze jours d'incubation à 30°C. Le temps d'incubation et la température sont les mêmes que ceux indiqués 30 ici, sauf indication contraire.

Agar de Czapek - Croissance blanche à jaune pâle de la colonie, faible croissance du mycelium aérien blanc pulvérulent; pas de pigment soluble.

35 Agar amidon-ammoniaqué - Croissance faiblement grisâtre avec mycelium aérien gris foncé pulvérulent; pas de pigment soluble. On constate une faible action diastasique.

Agar glucose-asparigine - Croissance blanche à légèrement ivoire de la colonie; pas de croissance ou faible croissance du mycelium aérien blanc pulvérulent; pas de pigment soluble.

40 Agar malate de calcium - Croissance crémeuse avec mycelium

aérien blanc à gris foncé pulvérulent; pas de pigment soluble. Le malate de calcium est solubilisé.

Agar tyrosine - Croissance végétative incolore ou légèrement brune sans mycelium aérien et sans pigment soluble.

- 5 Bouillon d'agar - Croissance crémeuse de la colonie sans mycelium aérien; pigment soluble brun produit. Pas de production d'hydrogène sulfuré après sept jours d'incubation.

- 10 Agar de Bennett - Croissance légèrement crémeuse de la colonie; pas de mycelium aérien et pas de pigment soluble. Après incubation à 37°C., croissance brune de la colonie avec un mycelium aérien gris foncé pulvérulent et production d'un pigment soluble brun.

- 15 Bouillon de glucose - Croissance crémeuse de la colonie avec un pigment soluble brun; pas de croissance de mycelium aérien.

Solution de glucose de Czapek - Faible croissance superficielle incolore de la colonie, et faible croissance du mycelium aérien pulvérulent, pas de pigment soluble. Le nitrate n'est pas ou peu réduit en nitrite.

- 20 Gélatine stabilisée - Croissance crémeuse sans mycelium aérien et sans pigment soluble après une incubation de 21 jours de 15 à 20°C. Il y a une faible liquéfaction de gélatine.

- 25 Lait de tournesol - La culture croît comme un noyau crémeux à la surface. Il y a production d'un pigment soluble brun, faiblement grisâtre. Il y a une légère peptonisation, mais pas de coagulation.

- 30 Fécule de pommes de terre - Croissance végétative crémeuse grisâtre avec une surface plissée; faible croissance du mycelium aérien blanc pulvérulent; production de pigment soluble brun foncé.

Agar de cellulose - Il n'y a pas de croissance avec des ions ammonium ou nitrate utilisés comme source de l'azote.

UTILISATION DE SOURCES DE CARBONE

- 35 L'utilisation de sources de carbone a été effectuée selon la méthode de Fridham et Gottlieb après sept jours d'incubation à 30°C

(a) Les substrats fréquemment utilisés comprennent; le glucose, le xylose, le mannose, le fructose et le mannitol.

- 40 (b) Les substrats modérément utilisés comprennent: l'arabinose, le rhamnose, le saccharose, le lactose, le tréhalose, le

raffinose et l'inositol.

(c) Le substrat peu utilisé est : la salicine.

L'ANTIBIOTIQUE

On produit le nouvel antibiotique de l'invention lorsque
5 la variété de Streptomyces achromogenes tomaymyceticus se développe dans un milieu nutritif dans des conditions aérobies, immergées contrôlées. On peut utiliser une grande variété de milieux nutritifs dans la phase de croissance du procédé. On a maintenant
10 trouvé que les meilleurs résultats étaient obtenus lorsque l'on utilisait un milieu aqueux contenant une source de carbone assimilable et une source d'azote assimilable, ou une matière du type protéique. On comprend dans les sources de carbone assimilables
des alcools polyhydriques et des mono-, di- et poly-saccharoses tels que le glucose, le fructose, le saccharose, le sucre, la
15 cassonade, l'amidon, l'amidon de blé, le galactose, la dextrine, la glycérine, les mélasses et les composés identiques. Les matériaux du type protéique comprennent des protéines non modifiées et des produits de dégradation des protéines, en particulier ceux qui se forment à partir de l'hydrolyse de protéines. Les composés
20 azotés assimilables et les matériaux du type protéique peuvent comprendre de la liqueur de blé macérée, de la levure, de la levure de bière, autolysée avec des solides laiteux, de la farine de soja, de la farine d'arachide, de la farine de graines de coton, de la farine de blé, des solides laiteux, des produits
25 de digestion pancréatique de la caséine, des résidus de distillation solubles, des liqueurs peptoniques animales, des extraits de farine, des peptones, de la farine de poisson, de l'extrait de levure, des petits morceaux de farine et d'os, et des matières inorganiques comme des nitrates et des sels d'ammonium. Ces sources
30 de carbone et d'azote bien qu'utilisées avantageusement sous forme combinée, n'ont pas besoin d'être pures pour être utilisées, de la même façon que des matières moins pures, qui contiennent des traces de facteurs de croissance et des quantités
considérables de matières nutritives minérales, sont appropriées
35 pour cette utilisation. Si on le désire, elles peuvent être alimentées par des sels minéraux comme le chlorure de sodium, le chlorure de potassium et des agents tampon comme le carbonate de calcium et le phosphate de calcium. On peut ajouter si nécessaire un agent anti-moussant comme de la paraffine liquide, des huiles
40 grasses ou des silicones, au milieu de fermentation.

Pour une croissance et un développement maxima de la variété de *Streptomyces achromogenes tomaymyceticus*, on doit ajuster le pH du bouillon de culture avant inoculation de l'organisme entre environ 5,5 et 8,0, et de préférence entre environ 6,0 et 7,0. On a observé que durant la période de croissance de l'organisme et la production de l'antibiotique, le milieu peut continuer à garder un pH compris entre environ 6,0 et 6,5. Il apparaît que la production d'antibiotique est optimale et maximale lorsque la température du bouillon de culture est maintenue entre environ 25 et 37°C, pendant 40 à 80 heures environ. Au bout de cette période, on a formé une quantité substantielle d'antibiotique.

Comme on le préfère pour la production d'autres antibiotiques en quantité importante, les conditions de culture aérobie immergée dépendent du choix de production en grande quantité de l'antibiotique. Pour la production de petites quantités d'antibiotique, on peut effectuer le procédé de culture immergée dans des petits ballons ou flacons qui sont, soit remués, soit agités par des procédés mécaniques convenables. Cependant, lorsqu'on désire de grands volumes du milieu nutritif inoculé, on peut les élever dans de grandes cuves ou réservoirs habituellement employés dans l'industrie de la fermentation. Pour la production de grandes quantités, il est préférable d'utiliser la forme végétative de l'organisme pour l'inoculation de la production, et des cuves et des réservoirs pour éviter un retard dans la croissance de la production de l'antibiotique.

Par conséquent, il est préférable d'abord de produire un inoculum végétatif de l'organisme en inoculant une quantité relativement faible de bouillon de culture avec des spores de l'organisme, et ensuite de transporter l'inoculum végétatif d'une façon aseptique aux vastes réservoirs ou cuves. Le milieu, dans lequel l'inoculum végétatif est produit, peut être le même ou différent de celui utilisé pour la production de l'antibiotique.

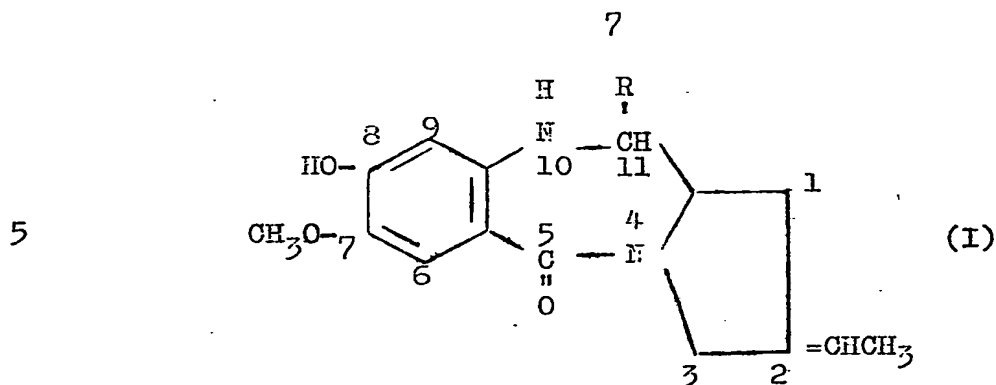
L'agitation et l'aération du mélange de culture peuvent être effectuées par des moyens variés. On peut utiliser un agitateur ou un procédé mécanique semblable pour tourner ou remuer le ferment, des procédés variés de pompage, ou le passage d'air stérile à travers le milieu. On peut réaliser l'aération par l'injection d'air stérile dans le mélange de fermentation ou en pulvérisant, en faisant gicler, en répandant le mélange dans ou à travers une atmosphère.

Après avoir séparé l'antibiotique conforme à l'invention de tout le bouillon, par filtration ou centrifugation, on peut le récupérer à partir du milieu de culture par des techniques d'extraction ou d'absorption, que l'on utilise couramment en relation avec la récupération d'autres antibiotiques. On peut effectuer l'extraction par l'utilisation de solvants de préférence des solvants organiques polaires comprenant des alcools comme le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol, le butanol; des esters alkyl d'acides gras comme l'acétate d'éthyle; des cétones comme l'acétone; des hydrocarbures chlorés comme le chloroforme; et la pyridine. On peut utiliser également d'autres solvants aux caractéristiques semblables. La combinaison de ces solvants est utilisée avantageusement. L'antibiotique peut être également récupéré dans le bouillon de culture par un agent absorbant comme de la terre d'infusoires, de l'alumine activée, du gel de silice, du charbon actif et de l'acide silicique. L'antibiotique est facilement élué de l'absorbant par un solvant organique polaire dans lequel il est soluble. Un procédé convenable de récupération de l'antibiotique à partir de l'extract ou de l'éluat comporte l'évaporation du solvant dans un relativement faible volume et la précipitation de l'antibiotique par addition d'un solvant miscible où il est soluble. L'antibiotique est ensuite purifié par recristallisation ou par chromatographie. Les solvants appropriés de recristallisation sont l'acétone en solution aqueuse, le méthanol en solution aqueuse, et tout autre solvant dans lequel l'antibiotique est insoluble. Les agents absorbants utilisés pour la récupération de l'antibiotique peuvent également servir d'une façon efficace pour la purification par chromatographie. Des éluants utilisés en liaison avec la récupération de l'antibiotique peuvent également servir.

L'antibiotique qui est isolé par les procédés qui sont couramment mentionnés ci-dessus se présente sous forme de poudre.

LES DERIVES

Les dérivés de l'antibiotique sont préparés par des procédés de traitement de l'antibiotique, isolé de l'extract ou de l'éluat ou non isolés, par des alcools, thioalcools et dialkylamines. Les dérivés conformes à l'invention répondent à la formule suivante :



10 dans laquelle R est un groupement oxyalkyl inférieur, un groupement aryl oxyalkyl inférieur, un groupement thioalkyl inférieur, un groupement aryl thioalkyl inférieur ou diaminoalkyl inférieur.

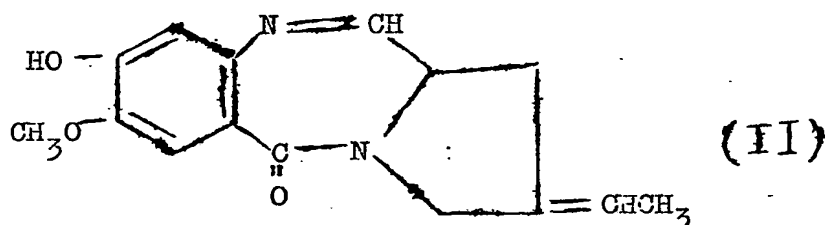
On peut effectuer cette réaction par des procédés comprenant simplement la dissolution de la poudre d'antibiotique dans des
15 alcools, thioalcools ou dialkylamines de formule

RH

dans laquelle R est un alcoxy inférieur, un alcoxy inférieur aryle, un alkylthio inférieur ou un dialkyl (inférieur) imino, et le refroidissement de la solution pour former des produits cristallisés. Les exemples d'alcools sont les alcools aliphatiques inférieurs ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et les alcools aromatiques ayant de 7 à 8 atomes de carbone. Comme alcool aliphatique inférieur, on utilise avantageusement le méthanol, l'éthanol, le propanol et l'isopropanol; comme alcools aromatiques on utilise l'alcool benzylique. Les exemples de thioalcools sont le néthanethiol, l'éthanethiol, le propanethiol, l'isopropanethiol et le toluène thiol. Parmi les dialkylamines (inférieur) on peut citer : la diméthylamine, la diéthylamine, la dipropylamine, la méthyléthylamine et la méthylpropylamine. D'autres alcools, thioalcools, et dialkylamines qui ne sont pas spécifiquement indiqués ici peuvent être également utilisés. Pour une préparation optimale et maximale des dérivés, on peut effectuer avantageusement la réaction dans un solvant inerte. Les exemples de solvants sont le chlorure de méthylène, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone et l'acétate d'éthyle. La température de réaction n'est pas limitée, mais on effectue de préférence la réaction à des températures comprises entre 25 °C et 35 °C. Il est bien entendu que l'addition des alcools, sus-cités des thioalcools, et des dialkylamines de formule RH, provoque l'introduction du radical
40 R desdits composés en position II sur le cycle.

Le composé de formule (I) peut être facilement transformé en un composé de formule suivante :

5



10

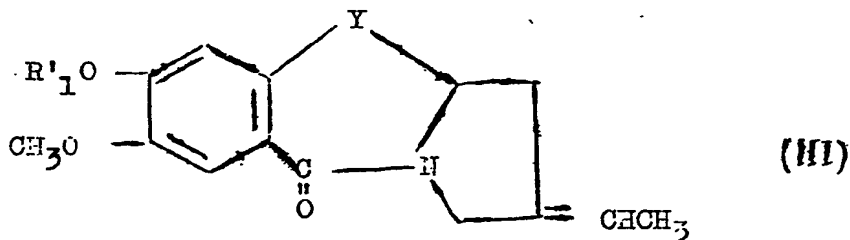
On peut effectuer l'élimination d'un substituant en position II sur le cycle par des procédés de dissolution du composé de formule (I) dans un solvant comme le n-hexane, l'acétonitrile, l'acétone, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. On peut utiliser efficacement un excès desdits solvants. Cette réaction d'élimination est réalisée de préférence à température ambiante, mais on peut également utiliser une température élevée pour favoriser la réaction et diminuer le temps de réaction. Le précipité formé en solution peut être recueilli par des techniques habituelles comme la filtration, la décantation, ou la centrifugation.

En utilisant les procédés de préparation du composé de formule (I) on peut facilement transformer le composé de formule (II) en un composé de formule (I). Les conditions et solvants utilisés pour la préparation du composé (I) peuvent être efficacement appliqués à cette réaction.

Les procédés de préparation des composés de formule I peuvent servir à transformer immédiatement les composés de formule II en composés de formule I. Les conditions et les solvants mis en oeuvre dans la préparation des composés de formule I peuvent également être appliqués.

Les composés de formule (I) et (II) peuvent être transformés par acylation en un composé de formule suivante :

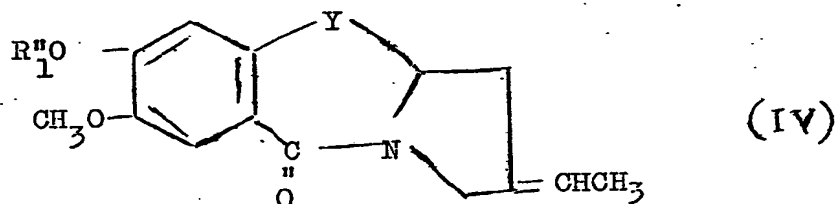
35



40

dans laquelle R'_1 est un groupe alkylcarbonyl inférieur, un groupe aryl alkylcarbonyl inférieur, ou un groupe arylcarbonyl et Y est -NH-CHR- ou -N=CH-, dans lequel R est le même qu'indiqué ci-dessus. On peut effectuer la réaction d'acylation en mélangeant le composé avec un agent acylant dans un solvant tel que la pyridine. On peut utiliser tout agent acylant capable de fournir un radical acyle qui réagit avec un groupe hydroxyle en position 8. Parmi ceux-ci on trouve des acides, des acides halogénés, des anhydrides d'acides, et des esters d'acide. Les exemples d'agent acylant sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide benzoïque, l'acide p-bromobenzoïque, leurs chlorures et bromures, leurs anhydrides, leurs esters méthyliques et éthyliques. On peut effectuer l'addition de tels agents acylants à température ambiante ou en refroidissant la solution. Les opérations qui comprennent la mise en place du mélange réactionnel et le refroidissement ou le versement d'un agent acylant dans un bain de glace, conduisent à la préparation de composés acylés. Ces composés acylés peuvent être cristallisés par dissolution d'un précipité dans un solvant tel que l'acétonitrile ou le méthanol, obtenu par filtration d'une préparation suivie d'une chromatographie du filtrat sur gel de silice, ou par lavage du filtrat avec de l'eau. Les composés cristallisés peuvent être isolés d'une solution par des techniques habituelles comme la filtration.

Les composés de formule (I) et (II) peuvent être de plus transformés par alkylation en un composé de formule suivante :

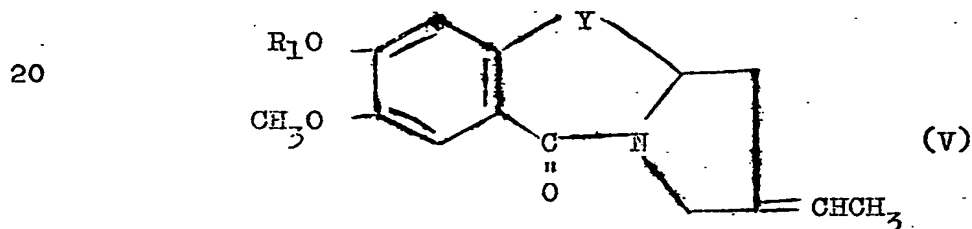


dans laquelle R''_1 est un groupe alkyl inférieur et Y est le même qu'indiqué ci-dessus. On peut effectuer la réaction d'alkylation en mélangeant le composé avec un agent alkylant dans un solvant tel que le méthanol. On peut utiliser tout agent alkylant capable de fournir un radical alkyle qui réagit avec un groupe hydroxyle sur la position 8 du composé. Parmi ceux-ci on peut citer les diazoalcanes et les sulfates de dialkyle. Comme exemples d'agents d'alkylation, on peut indiquer le diazométhane, le diazoéthane, et le sulfate de diméthyle. On peut réaliser cette

réaction d'alkylation d'une façon efficace en refroidissant le mélange réactionnel. Un procédé de préparation actuellement préféré comprend la mise en place de la solution dans un réfrigérateur, la concentration à sec, la dissolution dans du méthanol, l'addition d'éther à une solution de méthanol et le refroidissement de la solution étherée à 0°C. La préparation de composés alkylés peut être isolée par des techniques habituelles comme la filtration.

Les composés de formule (III) et (IV) où Y est -N=CH- peuvent être facilement transformés en un composé où Y est -NH-CHR-, où R est le même qu'indiqué ci-dessus. La réaction utilisée pour la conversion du composé de formule (II) en un composé de formule (I) peut être également employée.

Par commodité et pour donner un mode de réalisation simple des composés de cette invention, toutes les formules décrites précédemment sont représentées par la formule suivante :



25 dans laquelle R₁ est l'hydrogène, un groupe alkyl inférieur, un groupe alkylcarbonyl inférieur, un groupe aryl alkylcarbonyl inférieur ou un groupe arylcarbonyl, et Y est le même qu'indiqué ci-dessus, dans laquelle le groupe aryl inférieur possède 1 à 6
30 atomes de carbone et le groupe alkyl inférieur aryle possède de 7 à 8 atomes de carbone.

L'antibiotique et ses dérivés produits par les procédés cités ci-après, présentent une haute activité contre un certain nombre de microorganismes. On donne maintenant une description
35 de l'utilité du composé 11-méthoxy de formule I en tant qu'agent antimicrobien. L'activité du composé est exprimée par sa concentration d'inhibition minimum (MIC) qui est déterminée par la méthode habituelle de dilution en série de l'agar. Les tests sont réalisés pour des bactéries en utilisant un milieu de bouillon
40 de glucose et pour les champignons et la levure en utilisant un

milieu de Sabouraud. Il y a incubation du milieu test pendant 24 à 72 heures à 30°C, et les MIC sont exprimés par la concentration du composé en mcg/ml qui inhibe la croissance de l'organisme.

Les tests ont été effectués avec le composé méthoxy-II de

5 formule (I) et la suite représente les résultats.

Organismes tests		Concentration d'inhibition minimum
10	Staphylococcus aureus 209-P	6,2
	Bacillus subtilis ATCC 6633	12,5
	Corynebacterium xerosis	25,0
	Sarcina lutea	25,0
	Escherichia coli	100,0
	Pseudomonas aeruginosa	100,0
	Proteus vulgaris	100,0
	Aspergillus niger	50,0
	Penicillium chrysogenum Q-176	25,0
	Saccharomyces cerevisiae	50,0
15	Torula utilis	50,0
	Candida albicans	50,0

20 On mentionne ci-après les résultats des tests in vitro du composé méthoxy-II contre les bactériophages. Les tests ont été effectués en ajoutant un ml d'une suspension, contenant 2×10^4 particules du phage test par ml, dans un tampon 0,01M-tris-HCl (pH 7,2) à chaque dilution (1 ml) d'échantillon du composé à tester dans le tampon précédemment. Le mélange (0,1 ml) qui incube pendant une heure à 37°C est versé dans un vase de Pétri avec 1,5% d'agar nutritif. Le dénombrement des phages est réalisé par la méthode de stilliréaction avec la souche concernée dans laquelle la quantité qui rend inactif exactement 50% des phages est exprimée en mg par ml.

Phages tests		Concentration désactivant 50% des phages
30	phage Escherichia coli T ₁	0,1
	phage Escherichia coli T ₂	3,2
	phage Escherichia coli T ₃	0,2
	phage Escherichia coli T ₄	3,2
	phage Escherichia coli λ	1,0
	phage Escherichia coli β	12,5
	phage Escherichia coli MS-2	12,5
	phage Bacillus subtilis M-2	0,2
	phage Bacillus subtilis SP-10	0,2

Phages tests (suite)

Concentration désactivant 50%
des phages

phage <i>Lactobacillus acidophilus</i> J ₁	50,0
phage <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P ₁	12,5

- 5 On a trouvé que certains de ces composés étaient également efficaces contre les virus et les tumeurs. Le composé méthoxy-II de formule (I) est actif in vitro contre le DNA virus herpes simplex hominis. Dans ces essais, des doses de 0,1 et 0,05 mg/ml en solution dans l'eau distillée avec 10% de diméthylsulfoxyde
- 10 sont mélangées dans des tubes avec des quantités égales de virus en suspension dans une solution de Hanks IN, la dilution allant de 10 à 3,5. Après différents temps de contact à 22°C, la dose de 0,2 ml qui est titrée avant d'être en solution de Hanks comme LD₉₅, a été injectée dans le péritoine de groupes choisis au ha-
- 15 sard de dix souris mâles, pour la souche NMRJ et un poids de 15 à 19g. Comme contrôle on a injecté à dix souris 0,2 ml de mélange de virus en suspension et une solution d'eau distillée avec 10% de DMSO comme indiqué ci-dessus sans le composé méthoxy-II.
- 20 Comme résultats, le taux de mortalité à 100% du groupe contrôlé a été abaissé à 20% après une heure et quatre heures de contact, et à 0% après six heures de contact. Cela signifie que la virulence du DNA a été complètement ou partiellement annihilée par l'action du composé méthoxy-II. Le composé méthoxy-II présente une
- 25 inhibition complète pour des tumeurs ascites transplantables variées, telles que l'Ehrlich Carcinoma et le Cr. Sarcoma 180 de la souris, la souche NMRJ, et pour les souches AH 66R du Yoshida Sarcoma et AH 130 pour les rats de Wistar. Il est aussi efficace en
- 30 administration intratumorale contre le Carcino Sarcoma solide de Walker. Les souches de leucémie L1210-S et L1210-R (résistant au mercaptopurine-6) sont partiellement inhibées : 26-50% (L1210-S) et 51-75% (L1210-R) de prolongation de survies avec la dose bien tolérée de 0,125 mg par kg I.P. pour quatre applications en quatre
- 35 jours consécutifs. Dans tous ces tests avec les tumeurs acides transplantables, les souris et rats ont été transplantés avec une quantité distincte de cellules ou de matières cellulaires en solution de Hanks, la dose de ce produit, assurant 100% de survie.
- 40 Des groupes choisis au hasard composés de huit animaux par dose, pour les rats et de dix animaux par dose pour les souris sont traités pour la première fois quatre heures après la transplantation avec la dose de composé méthoxy-II, suivi par

l'application quotidienne de la même dose les trois jours suivants.

Les solutions sont préparés dans le triéthylèneglycol avec 90% d'eau distillée. Une dose simple est de 0,5 ml pour 20g chez la souris et 1 ml pour 100g chez le rat, elle est donc finalement calculée par kg.

L'activité du composé méthoxy-II dépend donc de la dose, mais une inhibition de 99% apparaît déjà avec une concentration de 0,0625 mg/kg I.P. dans les tumeurs ascites comme l'Ehrlich Carcinoma et le Cr. Sarcoma 180 de la souris, et avec 0,1 mg/kg I.P et 0,05 mg/kg I.P dans le Yoshida Sarcoma AH 66 R et le Yoshida Sarcoma AH 130 du rat. Toutes les doses mentionnées appliquées dans les essais chimio-thérapeutiques, sont bien tolérées par les animaux testés.

Les composés désirés conformes à l'invention peuvent être utilisés comme médicaments sous forme de préparation pharmaceutique qui contiennent l'antibiotique ou ses dérivés mélangés à un support pharmaceutique acceptable, organique ou inorganique, solide ou liquide pour l'administration orale ou parentérale. Les préparations pharmaceutiques peuvent avoir un aspect solide comme les cachets, les comprimés ou les dragées ou un aspect liquide comme les solutions, suspensions ou émulsions. Si on le désire, on peut ajouter dans les préparations précédentes des produits annexes comme par exemple des agents préservants, des stabilisants, des mouillants ou des émulsifiants, des sels pour faire varier la pression osmotique, et des agents tampons. Tandis que la posologie des composés varie d'un composé à l'autre et également suivant l'âge / l'état de chaque patient, on donne généralement des doses de 20 mg/kg pour traiter des maladies contre lesquelles l'antibiotique ou ses dérivés sont utilisés.

Les exemples suivants ont pour but d'illustrer le procédé de l'invention, mais ne doivent pas limiter sa portée.

EXEMPLE 1

La croissance végétative et les spores de la variété Streptomyces achromogenes tennycetiuis ATCC 21 353, élevés sur des plans d'agar ont été transportés dans un ballon de 500 ml contenant 100 ml du milieu suivant.

<u>Produits</u>	<u>Pourcentage en poids</u>
Lactose	3
Extrait de viande	1
Extrait de levure	1
Polypeptone	1
Chlorure de sodium	0,25

Ce milieu est stérilisé et inoculé à partir de plans d'agar. Il est agité pendant trois jours à 30°C.

Dans un réservoir en acier de deux tonnes on place mille litres d'un bouillon de fermentation ayant la composition suivante.

5	<u>Produits</u>	<u>Pourcentage en poids</u>
	Lactose	3
	Extrait de viande	1
	Extrait de levure	1
	Polypeptone	1
10	Chlorure de sodium	0,25
	Monophosphate de potassium	1,5
	Diphosphate de sodium(12H₂O)	0,43

Le pH du milieu est ajusté à 6,1. Le bouillon de culture est stérilisé par chauffage sous pression à environ 120°C pendant trente minutes. Le bouillon est refroidi et on ajoute d'une façon aseptique 1 ml environ de la culture inoculante précédente. L'organisme se développe dans le bouillon pendant 50 à 60 heures à une température de 30°C. Pendant la période de croissance, le bouillon est agité et on souffle au travers de l'air stérile à la vitesse d'environ 1 000 litres d'air stérile par minute sur un agitateur qui tourne à 350 tours par minute.

Après que la fermentation soit terminée, le mycelium est éliminé par centrifugation. La partie surnageante est traitée par absorption d'une substance active sur environ 5 kg de charbon actif et en le mélangeant pendant 30 minutes. Après filtration du mélange, le charbon actif est extrait par 100 litres d'un mélange de pyridine, d'ammoniaque, d'éthanol et d'eau dans le rapport de 10 : 3 : 80 : 10, et en le chauffant à 45°C pendant trente minutes, suivie de la réextraction du charbon actif. L'extrait est concentré sous pression réduite à 50°C, et lyophilisé pour donner 1,6 kg de poudres. Les poudres sont lavées avec environ 10 litres de n-hexane, dissous dans l'eau, et on ajuste le pH de la solution entre 2 et 3. La solution acidifiée est extraite par quatre fractions de 5 litres de chloroforme. Le chloroforme extrait est lavé avec une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 5%, séché sur du sulfate de sodium et concentré sous pression réduite à 50°C en un résidu huileux, que l'on traite par de l'éther de pétrole. La filtration de la solution d'éther de pétrole donne environ 20g de poudres que l'on dissout dans 100 ml d'acétate d'éthyle, que l'on absorbe sur une colonne d'acide silicique, et que l'on élue

avec environ 8 litres d'acétate d'éthyle. L'éluat est concentré presque jusqu'à sec et on ajoute ensuite 30 ml de méthanol. Le précipité se forme dans la solution de méthanol en le laissant à -20°C pendant deux jours, et on le filtre pour obtenir environ 1,8 g de produit cristallisé brut que l'on dissout ensuite dans environ 30 ml de méthanol chaud; On laisse reposer la solution de méthanol pendant deux jours à -20°C pour obtenir 1,2g de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c)(1,4)benzodiazépine-5-one, sous forme cristallisée pure, fondant à 145-146,5°C (décomposé).

Analyse calculée pour $C_{16}H_{20}N_2O_4$:

	C	H	O	N
	63,16	6,58	21,05	9,21
Trouvé	62,95	6,66	21,25	9,05

Le spectre d'absorption ultraviolet de ce composé dans le méthanol présente des pics principaux à 224 m μ (ϵ =36000) et 320 m μ (ϵ =3600) et des pics secondaires à 237 m μ (ϵ =30000) et 260 m μ (ϵ =9000), comme le montre la figure 1.

Le spectre d'absorption infrarouge dans le suspensioïde de Nujol présente des bandes à 3 340, 1 640, 1 570, 1 510, 1 425, 1 290, 1 265, 1 210, 1 190, 1 180, 1 070, 830, 800, ET 765 cm^{-1} , comme le montre la figure II.

On peut aussi extraire avec trois fractions de 30 litres de chloroforme, 100 litres de bouillon de fermentation produit comme dans l'exemple I précédent, que l'on a amené à pH=2 avec de l'acide chlorhydrique. Les couches de chloroforme sont rassemblées et concentrées jusqu'à 10 litres, et l'on ajoute ensuite 10 litres de méthanol. La solution est ultérieurement concentrée jusqu'à 300 ml par lente addition de méthanol. La solution de méthanol est placée dans un réfrigérateur afin de donner un précipité que l'on filtre et lave avec de l'acétate d'éthyle. La poudre obtenue est dissoute dans du méthanol chaud et on la laisse reposer à froid afin de faire précipiter un produit cristallisé que l'on cristallise dans le méthanol pour obtenir 2 g de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c)(1,4)benzodiazépine-5-one.

EXEMPLE 2

On extrait avec trois fractions de trente litres d'acétate d'éthyle, 100 litres du bouillon de fermentation produit dans l'exemple 1, que l'on a amené à pH=2 avec de l'acide chlorhydrique.

L'extrait est concentré à sec¹⁶ et dissous dans de petites quantités de chloroforme. La solution passe sur une colonne remplie de gel de silice. La colonne de gel de silice est éluée par un mélange de solvants, l'acétate d'éthyle et le chloroforme dans le rapport de 3 à 1. L'éluat est concentré à sec et dissous dans le n-hexane pour former un précipité. Le précipité est filtré, dissous dans le chloroforme et chromatographié comme indiqué précédemment pour obtenir de la poudre. La poudre est dissoute dans l'éthanol et mise à refroidir pour former un produit cristallisé que l'on recristallise dans l'éthanol pour obtenir des aiguilles jaunâtres de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-11-éthoxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)-benzodiazépin-5-one, fondant à 134-136°C (décomposé).

Analyse calculée pour $C_{17}H_{22}N_2O_4$:

15	C	H	O	N
	64,13	6,97	20,10	8,80
	Trouvé: 63,85	7,02	20,77	8,44

Il se produit des pics d'absorption ultraviolets dans l'éthanol à 225 m μ (ϵ = 38 000) et 325 m μ (ϵ = 6 700), et des pics secondaires à 235 m μ (ϵ = 35 000) et 262 m μ (ϵ = 11 000) comme la figure 3. Il y a des bandes d'absorption ultraviolettes dans le Nujol à 3 350, 1 640, 1 600, 1 570, 1 513, 1 425, 1 290, 1 265, 1 210, 1 190, 1 160, 1 130, 1 070, 890, 835, 800, 765, 710 cm⁻¹ comme le montre la figure 4.

25 EXEMPLE 3

Une solution de 1g de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépin-5-one avec un extrait de chloroforme ou d'acétate d'éthyle est concentrée en une petite quantité, que l'on traite avec du n-hexane pour former un précipité. Le précipité est filtré et lavé avec de l'éther, en le refroidissant pour obtenir une poudre jaunâtre d'environ 700 mg de 1,2,3,11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépin-5-one, fondant à 108-112°C (décomposé).

35 Analyse calculée pour $C_{15}H_{16}N_2O_3$:

	C	H	O	N
	66,16	5,92	17,63	10,29
Trouvé :	66,04	6,02	17,55	10,41

EXEMPLE 4

40 A une solution de 100 mg de 1,2,3,10,11, 11a-hexahydro-2-

- éthylidène-8-hydroxy-7,11-diméthoxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one, dans 5 ml de pyridine, on ajoute, goutte à goutte 0,2 ml d'anhydride acétique tout en refroidissant la solution. On laisse reposer une nuit le mélange réactionnel à température ambiante, et on le verse dans un bain de glace pour obtenir un précipité que l'on filtre, lave dans l'eau, dissout dans 1 ml de méthanol et met à refroidir. Le précipité obtenu est recristallisé dans le méthanol pour donner des aiguilles jaunâtres de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-acétyloxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one, fondant à 132-133°C.

Analyse calculée pour $C_{18}H_{22}N_2O_5$:

	C	H	O	N
	62,41	6,40	23,10	8,09
Trouvée :	62,30	6,53	23,24	7,95

15 EXEMPLE 5

- A une solution de 300 mg de 1,2,3,10,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one, dans 5 ml de pyridine, on ajoute 400 mg d'anhydride p-bromobenzoïque. On laisse reposer le mélange réactionnel une nuit pour donner un précipité que l'on filtre, lave dans le chloroforme, lave avec une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 5% et d'acide chlorhydrique 2N et concentre en une petite quantité. On l'adsorbe sur une colonne en gel de silice et l'on élue avec un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle dans le rapport 8 à 1. L'éluat est concentré pour former du 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-p-bromobenzoyloxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one que l'on traite avec de l'acétonitrile pour obtenir des aiguilles blanches de 1,2,3,11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-p-bromobenzoyloxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one, fondant à 204-205°C.

Analyse calculée pour $C_{22}H_{19}N_2O_4Br$:

	C	H	O	N	Br
	58,02	4,17	14,07	6,15	17,58
Trouvé :	58,12	4,25	14,00	6,50	17,58

35 EXEMPLE 6

- A une solution de 100mg de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one, on ajoute goutte à goutte une solution étherée de diazométhane. On laisse reposer le mélange réactionnel une nuit à froid, on le concentre à sec et on le dissout dans 10 ml

69 45316

2027356

l'éther, suivi par l'addition de 10 ml d'éthanol et on maintient la solution à 0°C pour obtenir des aiguilles jaunâtres de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,8,11-triméthoxy-5H-pyrrolo(2,1-c)(1,4)benzodiazépine-5-one fondant à 88°C.

5	Analyse calculée pour $C_{17}H_{22}N_2O_4$:			
	C	H	O	N
	64,13	6,97	20,10	8,80
	Trouvé: 64,33	7,05	20,24	8,60

EXAMPLE 7

10 A une solution de 0,54g de 1,2,3,11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one, dans 5 ml de dichlorométhane, on ajoute 0,25g d'α-toluène-thiol. Après 5 heures d'agitation, on laisse reposer le mélange réactionnel pendant 4 jours à température ambiante. La distilla-
15 tion de dichlorométhane sous pression réduite et à température inférieure à 50°C, donne une poudre jaune qui est purifiée par chromatographie en couche mince afin d'obtenir 0,14 g de 1,2,3, 10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-11-benzylthio 5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one. Elle est ensuite
20 recristallisée dans du benzène en un produit cristallisé pur, fondant à 143-145°C.(décomposé).

	Analyse calculée pour $C_{22}H_{24}N_2O_3S$:		
	C	H	N
	66,72	6,11	7,07
25 Trouvé :	66,70	6,00	6,52

EXAMPLE 8

A une solution de 0,27 g de 1,2,3,11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)benzodiazépine-5-one dans 5 ml de dichlorométhane, on ajoute 1,5 ml d'éthanethiol.

30 On laisse reposer la solution pendant 6 jours, et on concentre le mélange réactionnel sous pression réduite, ce qui laisse un résidu que l'on dissout dans l'eau. On ajoute du dichlorométhane pour former une couche de dichlorométhane que l'on sépare, lave avec de l'eau et sèche sur du sulfate de magnésium. La distillation

35 d'un solvant de la solution donne 0,2g de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-11-éthylthio-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one, cristallisé jaune, fondant à 70-74°C (décomposé)

40 Analyse calculée pour $C_{17}H_{22}N_2O_3S$:

	N
	8,65

COPY

Trouvé : 8,15

19

EXEMPLE 9

A une solution de 0,54g de 1,2,3,11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one, dans 5 cm³ de dichlorométhane, on ajoute une solution de 1,2g de diméthylamine. Après 5 heures d'agitation, on laisse reposer le mélange réactionnel pendant 4 jours. La couche de dichlorométhane est séparée, lavée avec de l'eau et séchée sur du sulfate de magnésium. On élimine ensuite un solvant sous pression réduite pour laisser une poudre brune faiblement jaunâtre de 1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-11-diméthylamino-5H-pyrrolo (2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one (0,3g). Elle est ensuite purifiée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice pour obtenir un produit cristallisé, pur, brun jaunâtre, fondant à 65-68°C (décomposé)

EXEMPLE 10

A une solution de 0,27 g de 1,2,3, 11a-tétrahydro-2-éthylidène-7-méthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo (2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one dans 5 ml de dichlorométhane, on a ajouté 1,5 ml de méthanol et le mélange a été agité pendant 5 jours. Le mélange réactionnel a été concentré sous pression réduite et refroidi dans un réfrigérateur pour former le précipité qui après filtration avait l'aspect d'une substance cristalline et était de la 1,2,3,10,11, 11a-hexahydro-2-éthylidène-7,11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo (2,1-c) (1,4) benzodiazépine-5-one qui fond à 145-146,5°C en se décomposant.

EXEMPLE 11

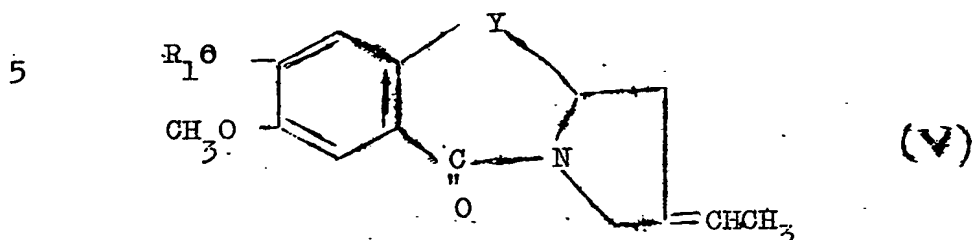
Une formule injectable sous forme d'ampoule a la composition suivante :

30	1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-éthylidène-7-11-diméthoxy-8-hydroxy-5H-pyrrolo(2,1-c) (1,4)-benzodiazépine-5-one.....	0,02g
	Ethanol.....	10,00ml
	Eau distillée.....	100,00ml
	Hydroxyde de sodium.....	q.s.
35	pH	7,5

COPY

REVENDICATIONS

1 - Procédé de préparation d'un composé de formule :

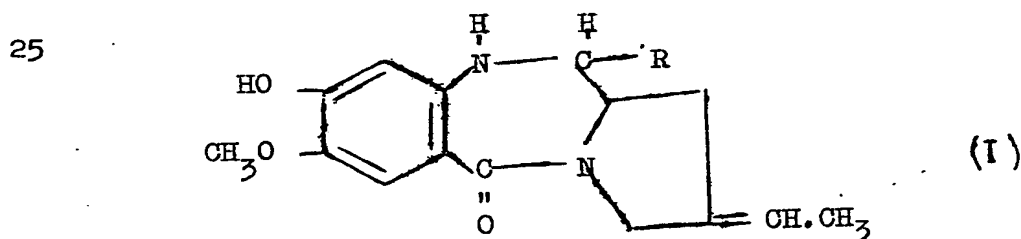


- 10 dans laquelle R_1 est l'hydrogène, un groupe alkyl inférieur, un groupe alkylcarbonyl inférieur, un groupe aryl alkylcarbonyl inférieur ou arylcarbonyl et Y est $-N=CH-$ ou $-NH-CHR-$, caractérisé en ce que R est un groupe oxyalkyl inférieur, un groupe aryl oxyalkyl inférieur, un groupe thioalkyl inférieur, un groupe aryl
- 15 thioalkyl inférieur ou un groupe diaminoalkyl inférieur, qui comporte :

(1) la culture d'une variété de *Streptomyces achromogenes* tateyamensis ATCC 21 353 ou de ses espèces mutantes très voisines dans un milieu nutritif dans des conditions aérobies immergées, et la

20 production d'une substance antibiotique dans ledit milieu jusqu'à ce que l'on ait une quantité importante; ou

(2) le traitement de l'antibiotique, isolé ou non du bouillon de culture avec de l'alcool pour obtenir un composé de formule :



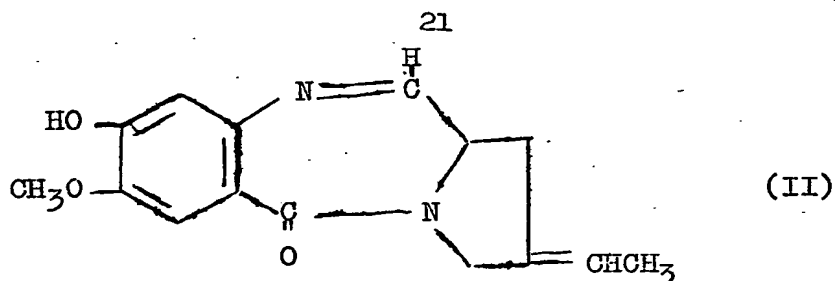
30

dans laquelle R est un groupe oxyalkyl inférieur ou un groupe aryl oxyalkyl inférieur; ou

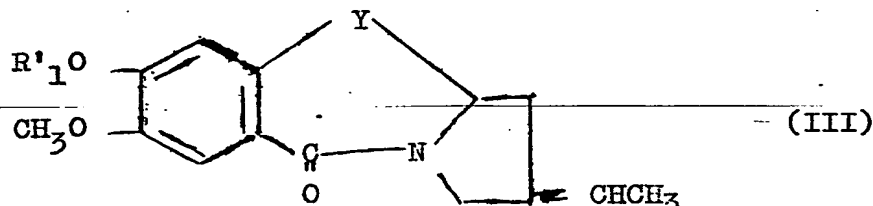
- (3) la transformation d'un composé de formule (I) dans un solvant
- 35 non alcoolique en un composé de formule :

5

ou

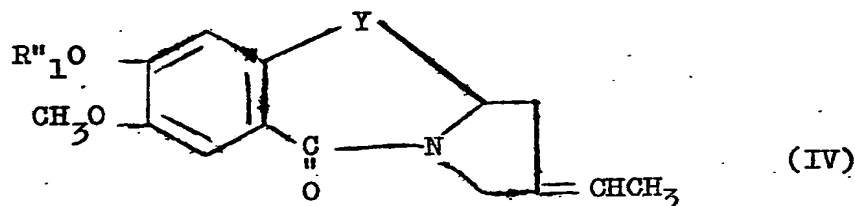


(4) l'acylation d'un composé des formules (I) et (II) avec un agent acylant pour obtenir un composé de formule :



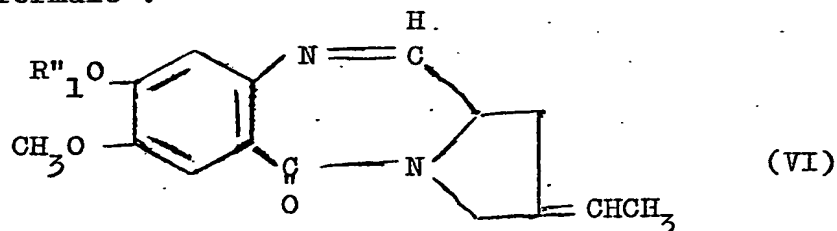
dans laquelle R'_1 est un groupe alkyl inférieur un carbonyl alkyl inférieur aryle ou un carbonyl aryl et Y à la même signification que ci-dessus; (ou)

(5) l'alkylation d'un composé de formules (I) et (II) par un agent alkylant pour obtenir un composé de formule :



dans laquelle R''_1 est un groupe alkyl inférieur et Y est - N = CH - ou - NH-CHR- dans lesquels R a la même signification que ci-dessus.

(6) la transformation d'un composé de formule (VI) dans laquelle Y est -NH-CHR- dans lequel R a la même signification que ci-dessus, dans un solvant non alcoolique en un composé de formule :



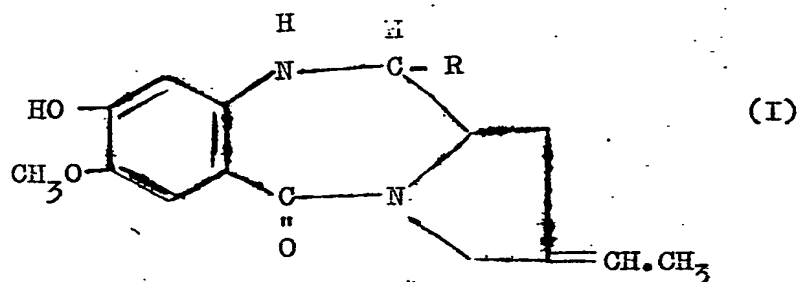
dans laquelle R¹, a la signification précédente; et

- (7) la réaction d'un composé de formule (II) avec un alcool, un thioalcool ou une dialkylamine pour obtenir un composé de formule (I) dans laquelle R est un groupe oxyalkyl inférieur, un groupe aryl oxyalkyl inférieur, un groupe thioalkyl inférieur, un groupe aryl thioalkyl inférieur ou un groupe dialkylamino inférieur.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on prépare un composé de formule (V).

- 3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on produit une substance antibiotique par un procédé qui comporte la culture de la variété *Streptomyces achromogenes tateyamensis* ATCC 21 353 ou ses espèces mutantes très voisines dans un milieu nutritif dans des conditions aérobies immergées, et la production de ladite substance antibiotique dans ledit milieu jusqu'à ce qu'on en ait une quantité importante.

4 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'un composé de formule :



- dans laquelle R est un groupe oxyalkyl inférieur, est préparé par des procédés qui comprennent la culture de la variété de *Streptomyces achromogenes tateyamensis* ATCC 21 353 ou de ses espèces mutantes très voisines dans un milieu nutritif dans des conditions aérobies immergées la production de l'antibiotique dans le bouillon de culture, l'extraction dudit antibiotique à partir du bouillon de culture et le traitement dudit antibiotique par un alcool.

- 5 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'organisme est la variété de *Streptomyces achromogenes tateyamensis* ATCC 21 353.

- 6 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on inclut l'opération d'extraction du bouillon de culture à un pH d'environ 2 à 3 par un solvant polaire organique miscible à l'eau.

7 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu de culture est maintenu à une température d'environ 25°C à 35°C, et la croissance de l'organisme se déroule pendant une période d'environ 50 à 60 heures.

5 8 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'alcool est le méthanol ou l'éthanol.

9 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'un composé de formule (II) est obtenu par traitement d'un composé de formule (I), dans laquelle R est un groupe alkyl inférieur, dans un solvant organique non alcoolique.

10 10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'un solvant organique non alcoolique est le n-hexane.

11 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on inclut l'opération d'alkylation d'un composé de formule (II), dans laquelle R est un groupe oxyalkyl inférieur, par un agent alkylant.

12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'un agent alkylant est le diazométhane.

13 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on inclut l'opération d'acylation d'un composé de formule (I), dans laquelle R est un groupe oxyalkyl inférieur, par un agent acylant.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'un agent acylant est l'anhydride acétique ou l'anhydride p-bromobenzoïque.

15 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on inclut l'étape de réaction d'un composé de formule (II) avec un thioalcool ou une dialkylamine.

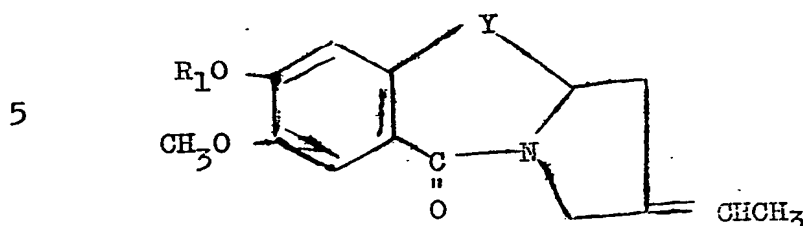
16 - Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'un thioalcool est le méthaneethiol ou l' α -toluèneethiol.

17 - Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'une dialkylamine est la diméthylamine.

18 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on inclut l'opération de transformation d'un composé de formule (IV), dans laquelle R¹ est un groupe arylalkylcarbonyl inférieur et R est un groupe oxyalkyl inférieur, dans un solvant organique non alcoolique, en un composé de formule (V).

19 - Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'on utilise l'acétonitrile comme solvant organique non alcoolique.

20 - Composé de formule :



- 10 dans laquelle R_1 est l'hydrogène, un groupe alkyl inférieur, un groupe alkylcarbonyl inférieur, un groupe aryl alkylcarbonyl inférieur ou aryl carbonyl et Y est $-N=CH-$ ou $-NH-CHR-$, caractérisé en ce que R est un groupe oxyalkyl inférieur, un groupe aryl oxyalkyl inférieur, thioalkyl inférieur, aryl thioalkyl inférieur
- 15 ou diaminoalkyl inférieur.

21 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-N=CH-$.

22 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est le groupe oxy p-bromobenzyl et Y est $-N=CH-$.

- 20 23 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe oxyméthyle.

24 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe

25 oxyéthyle.

25 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est le groupe méthylcarbonyl et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe oxyméthyle.

- 26 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est le groupe oxy p-bromobenzyl et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe oxyméthyle.
- 30

27 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est le groupe méthyl et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe oxyméthyle.

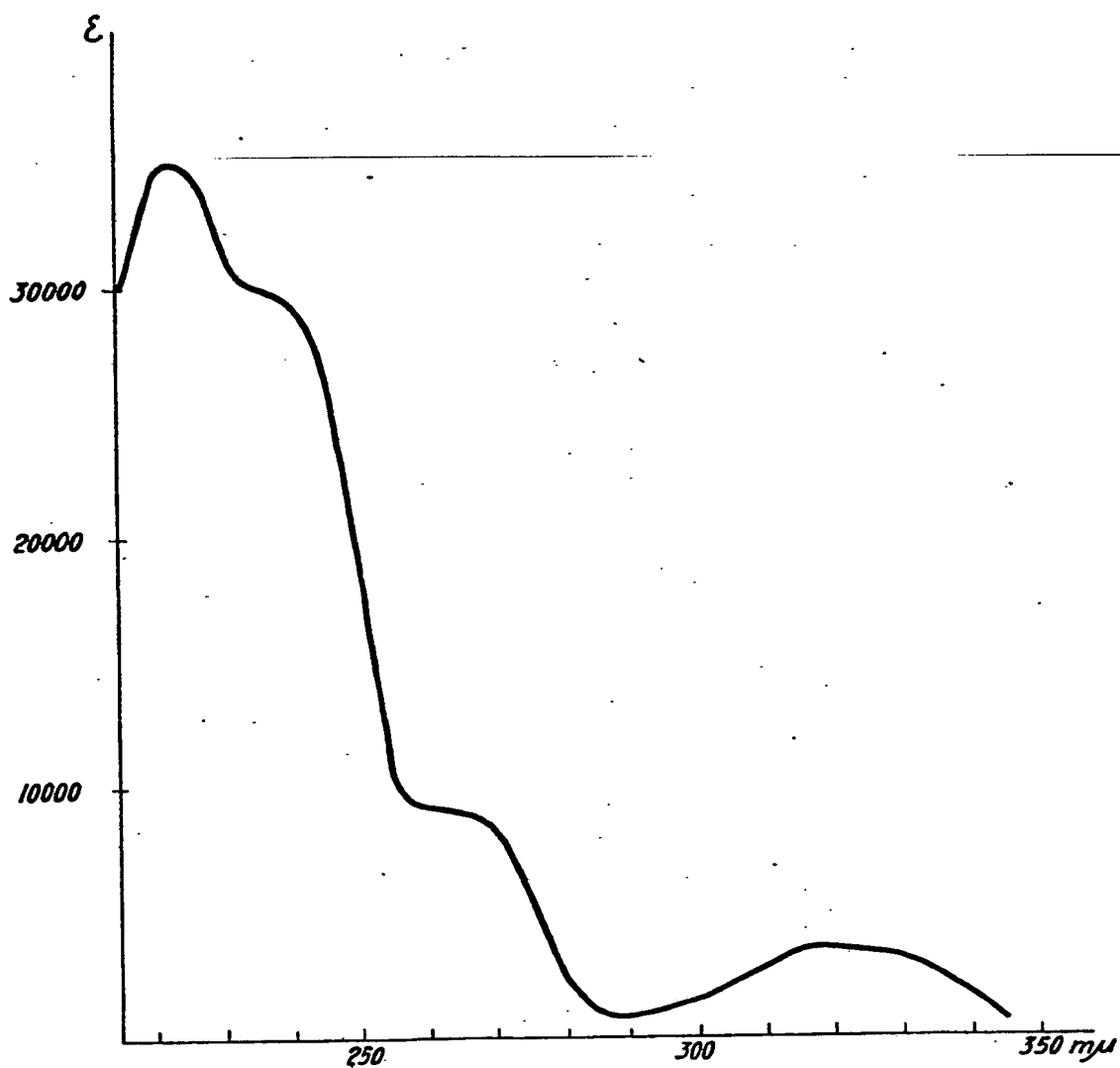
- 35 28 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe thio-benzyle.

29 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-NH-CHR-$, où R est le groupe thio-benzyle.

- 40 30 - Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R_1 est l'hydrogène et Y est $-NH-CHR-$ où R est le groupe diaminométhyle.

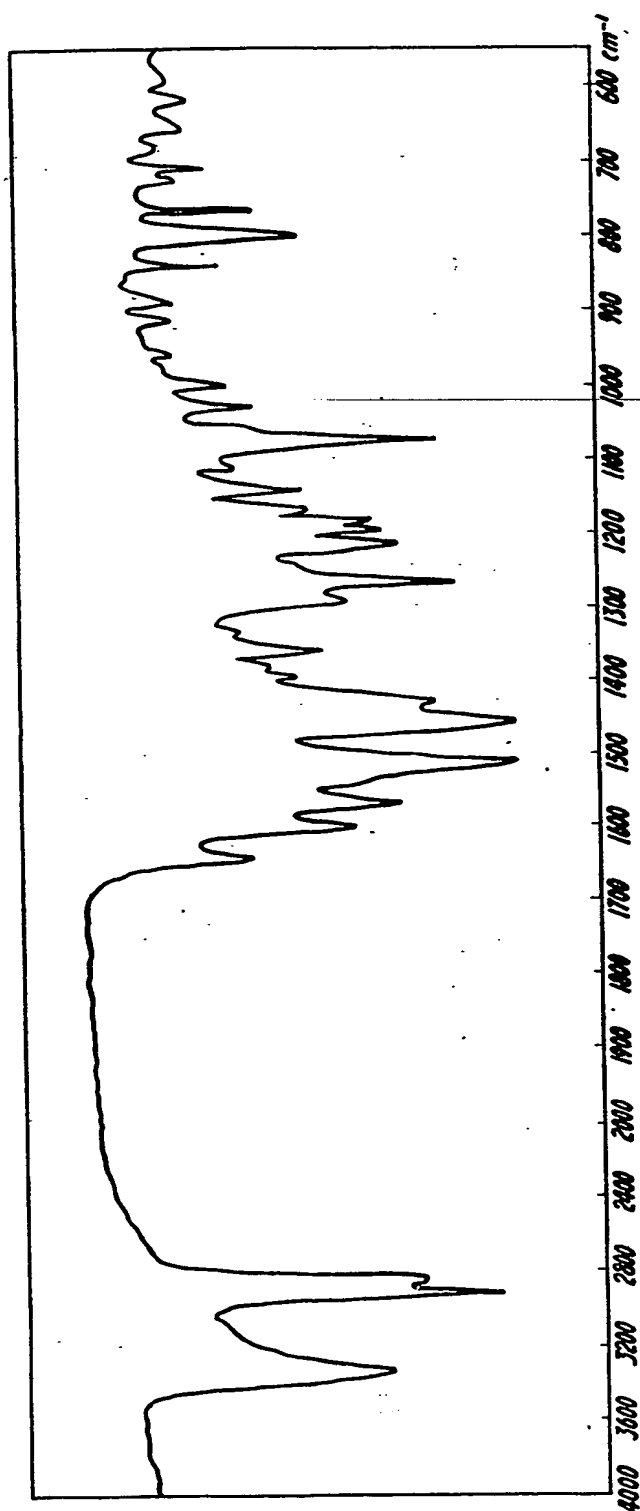
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG.2



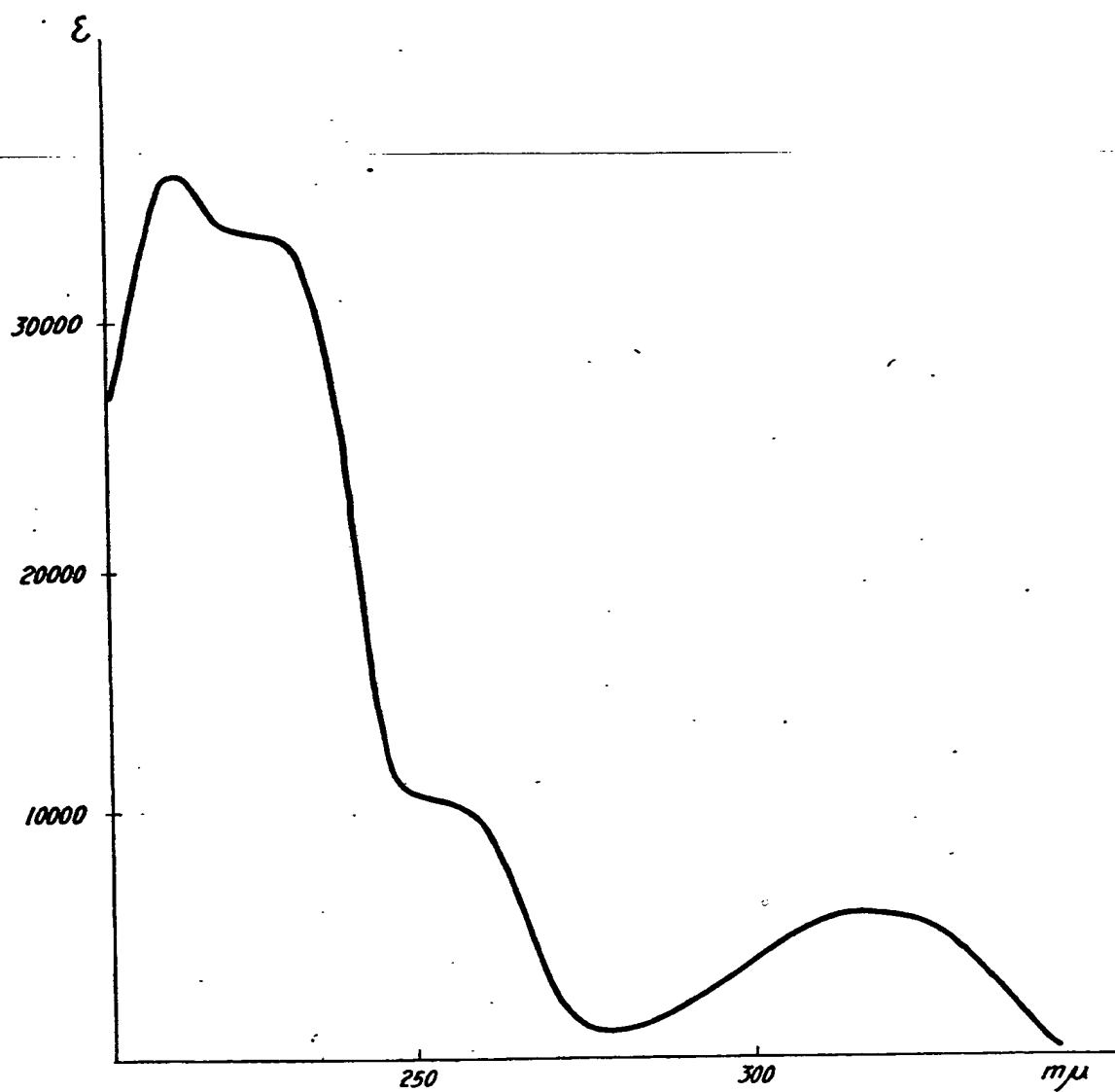
THIS PAGE BLANK (USPTO)

69 45316

Pl. III/4

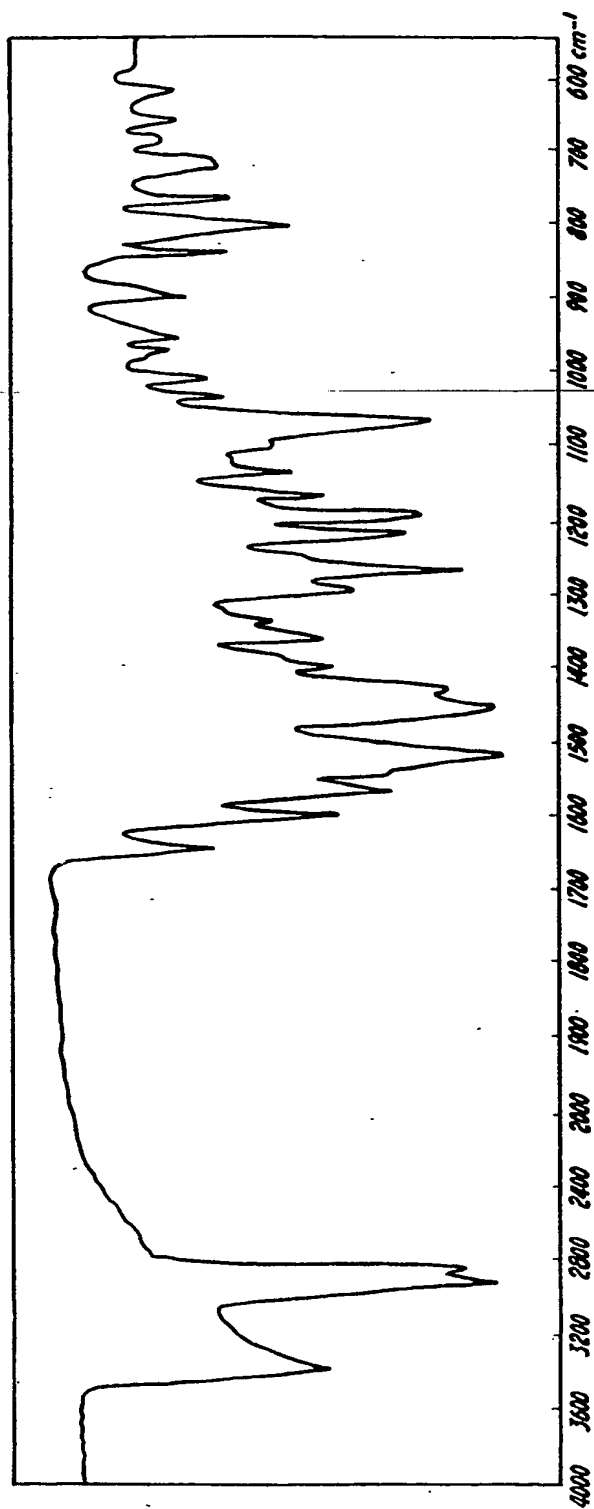
2027356

FIG. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)